

Searching PAJ

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-065777  
 (43)Date of publication of application : 03.03.2000

G01N 27/327

(51)Int.Cl.

(21)Application number : 10-235073  
 (22)Date of filing : 21.08.1998

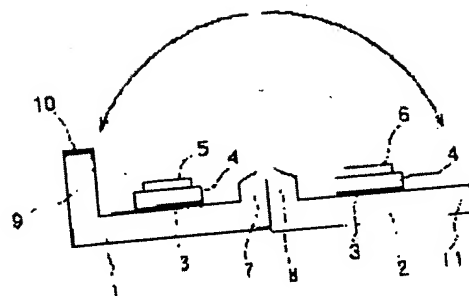
(71)Applicant : NOK CORP  
 (72)Inventor : GOTO MASAO  
 TAMURA YUZURU

## (54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To facilitate the production of a biosensor by fixing oxidoreductase on an electrode and arranging an acting electrode and a counter electrode so as to take a facing structure.

**SOLUTION:** The acting electrode 5 and counter electrode 6 are formed on two substrates 1, 2 through the insulating layers 4 bonded to the substrates 1, 2 with adhesive layers 3 and oxidoreductase is fixed to at least one of them. These substrates 1, 2 are integrated by the bendable rising parts 7, 8 provided to the side surface parts of the respective substrates 1, 2 and these rising parts 7, 8 are bent. The other end part 11 of the substrate 2 is bonded on the end part adhesive layer 10 of the rising part 9 which has the same height as the rising parts 7, 8, formed to the other end part of the substrate 1 to be fixed thereto. Further, the fixing can be performed without using an adhesive by providing such a structure that end part rising parts are provided to both substrates 1, 2 to mutually engage the substrates 1, 2. By this constitution, the acting electrode 5 and the counter electrode 6 can be arranged in a spaced facing structure.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

Searching PAJ

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**BEST AVAILABLE COPY**

<http://www19.ipdl.ncipi.go.jp/PA1/result/detail/main/wAAAuTaW4ODA4120...> 4/20/

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-65777

(P2000-65777A)

(43) 公開日 平成12年3月3日(2000.3.3)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 Z

3 5 3 R

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-235073

(22) 出願日 平成10年8月21日(1998.8.21)

(71) 出願人 000004385

エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

(72) 発明者 後藤 正男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ

オーケー株式会社内

(72) 発明者 田村 譲

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ

オーケー株式会社内

(74) 代理人 100066005

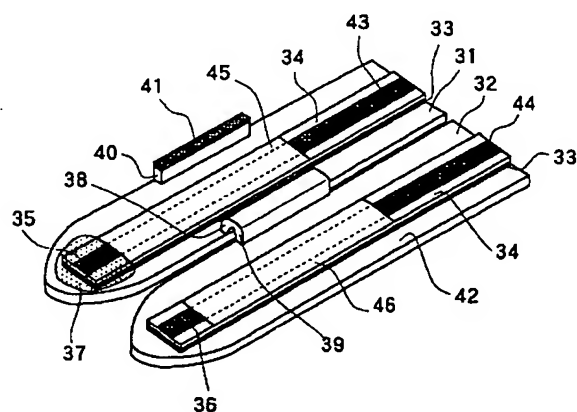
弁理士 吉田 俊夫

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 酸化還元酵素を電極上に固定し、作用極と対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサであって、製作が容易であるものを提供する。

【解決手段】 酸化還元酵素を作用極上および対極上の少くとも一方に固定化したバイオセンサにおいて、絶縁膜を介して作用極および対極をそれぞれ形成させた2枚の基板を、基板側面部に設けられた折曲げ可能な立上り部によって一体化させ、該立上り部を折り曲げると共に、基板他端側面部に形成させた立上り部を固定させることにより、作用極と対極とが離間した対面構造をとるように配置したバイオセンサ。



(2)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸化還元酵素を作用極上および対極上の少くとも一方に固定化したバイオセンサにおいて、絶縁膜を介して作用極および対極をそれぞれ形成させた2枚の基板を、基板側面部に設けられた折曲げ可能な立上り部によって一体化させ、該立上り部を折り曲げると共に、基板他端側面部に形成させた立上り部により基板他端部同士を固定させることにより、作用極と対極とが離間した対面構造をとるように配置したバイオセンサ。

【請求項2】 基板他端側面部に形成させた固定用立上り部が一方の基板にのみ設けられた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 基板他端側面部に形成させた固定用立上り部が両方の基板に設けられた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項4】 作用極上に酸化還元酵素-電子伝達体混合物層が形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項5】 作用極上および対極上に酸化還元酵素-電子伝達体混合物層が形成された請求項1記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化還元酵素を電極上に固定化したバイオセンサに関する。更に詳しくは、酸化還元酵素を電極上に固定化し、作用極と対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】グルコースオキシダーゼを作用極上に固定化せしめた従来のグルコースバイオセンサにあっては、作用極以外に対極あるいは対極と参照極とが平面状基板の同一面上に配置されている。このような電極配置のグルコースバイオセンサにおいて、測定サンプルを電極に接触させるには2つの方法がとられている。

【0003】その第1の方法は、直接測定サンプルを電極上に滴下する方法であるが、この方法ではサンプリングから滴下迄手間と時間を要するという問題がある。その第2の方法は、電極基板の上に溝を有するスペーサを配置し、その上に更に空気孔を設けたカバーを配置した構造のものをを用いるという方法である。この方法では、測定サンプルが直接電極上に導かれるため手間や時間がとられないという利点がある反面、空気孔の設置を必要とするなど、素子製作において煩雑な工程を必要とするという欠点を有している。

【0004】そこで、本出願人は先に、グルコースオキシダーゼを電極上に固定化せしめたグルコースバイオセンサであって、製作および測定が容易であり、従って使い捨てグルコースバイオセンサとして好適なものとして、作用極および対極とを対面構造をとるように配置し、より具体的には作用極を配置した基板と対極を配置

2

した基板との間にスペーサを介在させることにより対面構造をとるように配置したものを提案している(特開平10-2874号公報)。

【0005】かかるグルコースオキシダーゼは、微量サンプルでも測定を可能とするという所期の目的は達成させるものの、スペーサを介在させているため、製作工程が煩雑となり、コストアップをもたらすという欠点のみられた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、酸化還元酵素を電極上に固定し、作用極と対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサであって、製作が容易であるものを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】かかる本発明の目的は、酸化還元酵素を作用極上および対極上の少くとも一方に固定化したバイオセンサにおいて、絶縁膜を介して作用極および対極をそれぞれ形成させた2枚の基板を、基板側面部に設けられた折曲げ可能な立上り部によって一体化させ、該立上り部を折り曲げると共に、基板他端側面部に形成させた立上り部を固定させることにより、作用極と対極とが離間した対面構造をとるように配置したバイオセンサによって達成される。

【0008】

【発明の実施の形態】基板側面部に設けられた折曲げ可能な立上り部を折り曲げると共に、基板他端側面部に形成させた立上り部によって基板他端部同士を固定させることにより、対面構造配置がとられるが、基板他端側面部に形成させた固定用立上り部は、一方の基板にのみ設けられる場合と両方の基板に設けられる場合の2通りのいずれの方法によっても行うことができる。

【0009】図1に記載された態様にあっては、2枚の基板1, 2には、それぞれ接着剤層3によって接着された絶縁層4を介して、作用極5および対極6が形成されており、作用極5上および対極6上の少なくとも一方には酸化還元酵素を固定化させることができる。これら2枚の基板1, 2は、それらの基板側面部に設けられた折曲げ可能な立上り部7, 8によって一体化されており、この立上り部7, 8を折り曲げ、一方の基板1の他端部に形成させた立上り部9(折曲構造立上り部7, 8の立上り高さと同じの高さを有する)の端部接着層10に他方の基板2の他端部11を接着させて固定することにより、作用極5と対極6とが離間した対面構造配置がとられるようになる。

【0010】なお、この場合の立上り部9の長さは、電極同士の確実な離間対面構造配置が確保される限り、基板の長さ方向の全長にわたる必要はない。また、他端部立上り部の固定は、図2に例示させる如く、接着によるのではなく、一方の基板の他端部立上り部21と他方の基板の他端部立上り部22とを、互いに係合し得る構造23を

(3)

3

とることによって行うこともできる。

【0011】更に、図3に記載された態様にあつては、先端部にテーパ部を有する2枚の基板31, 32には、接着剤層33によって接着された絶縁層34を介して、作用極35および対極36が形成されており、作用極35上には酸化還元酵素37が固定化されている。これら2枚の基板31, 32は、それらの基板側面部に設けられた折曲げ可能な立上り部38, 39によって一体化されており、この立上り部38, 39を折り曲げ、一方の基板1の他端部に形成させた立上り部40の端部接着剤層41に他方の基板32の他端部42を接着させて固定することにより、作用極35と対極36とが離間した対面構造配置がとられるようになる。

【0012】なお、符号43, 44はそれぞれ作用極リード部および対極リード部であり、これらのリード部は布等によって研磨されていることが好ましく、またそれらの一部は電極部分を残した状態で、例えば熱硬化性ポリエステル等の絶縁膜44, 45で覆われている。

【0013】これらの立上げられた折曲構造あるいは他端部に形成させた立上り部の高さは、当然のこととして作用極および対極が接触しない間隔を保持し得るものでなければならず、その間隔は一般に約100~500 $\mu\text{m}$ (約0.1~0.5mm)、好ましくは約150~350 $\mu\text{m}$ (約0.15~0.35mm)で設定される。例えば、図1に示された態様にあつては、約100~2000 $\mu\text{m}$ (約0.1~2mm)の厚さを有する樹脂製基板上に、約25 $\mu\text{m}$ の接着剤層、約40 $\mu\text{m}$ のPET樹脂製絶縁層および約10 $\mu\text{m}$ のカーボン電極(合計75 $\mu\text{m}$ )がいずれもスクリーン印刷法により両方の基板上に設けられ、これに対して一方の基板の端部に形成させた立上り部は基板面からみて310 $\mu\text{m}$ の高さを有するので、結局電極間間隔は160 $\mu\text{m}$ となる。

【0014】少くとも作用極上に固定化せしめる酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ等があり、これらによってグルコース、乳酸、アルコール、ピルビン酸、抗原等の有機物質、塩素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、水素イオン、溶存酸素等の電解質や無機物質の濃度測定が可能であるが、最も一般的に用いられるグルコースオキシダーゼによるグルコース濃度の測定法について、以下で説明することとする。

【0015】グルコースオキシダーゼは、一般には作用極上に固定化せしめるが、グルコースオキシダーゼは測定サンプルである水溶液中に溶解され、作用極上で反応するようになるため、作用極周辺、対極またはその周辺などに固定化させていてもよい。

【0016】グルコースオキシダーゼの電極への固定化、好ましくは作用極上への固定化は、以下に列挙され

4

る如く、グルコースオキシダーゼ単体としてばかりではなく、電子伝達体(メディエータ)およびアルブミンの少なくとも一種を添加した混合物層としても形成される。

- (1) グルコースオキシダーゼ層
- (2) グルコースオキシダーゼ-電子伝達体混合物層
- (3) グルコースオキシダーゼ-アルブミン混合物層
- (4) グルコースオキシダーゼ-電子伝達体-アルブミン混合物層

【0017】グルコースオキシダーゼ層(1)の形成は、グルコースオキシダーゼ(GOD)を、例えば165800単位/gのGODの場合その約1~50mg、好ましくは約5~30mgを蒸留水またはクエン酸緩衝液(約0.05~0.2M濃度)1mlに溶解させ、その溶液(GOD溶液)約0.5~10 $\mu\text{l}$ 、好ましくは約1~3 $\mu\text{l}$ を滴下法、スピンコート法などによって滴下し、室温で乾燥させて、膜厚約0.05~10 $\mu\text{m}$ 、好ましくは約0.1~2 $\mu\text{m}$ の層を形成させることにより行われる。

【0018】混合物層(2)~(4)の場合にも、この場合と同様の形成方法が行われ、ただしGOD水溶液中に更に次の各成分が添加された溶液が用いられる。

混合物層(2)の場合：フェリシアン化カリウム、パラベンゾキノン等が電子伝達体として用いられ、フェリシアン化カリウムにあつては約1~100mg、好ましくは約30~60mgを、パラベンゾキノンにあつては約1~200mg、好ましくは約50~150mgを更に添加した溶液を使用

混合物層(3)の場合：牛血清アルブミンを約1~100mg、好ましくは約5~30mgを更に添加した溶液を使用

混合物層(4)の場合：混合物層(2)の形成に用いられた量の電子伝達体および混合物層(3)の形成に用いられた量の牛血清アルブミンを更に添加した溶液を使用

【0019】添加された電子伝達体は下記の如く作用し、またアルブミンやクエン酸緩衝液の添加は、測定液(グルコース水溶液)のpH変化に対して出力誤差を抑制し、バラツキのより少ない測定結果を与える。また、ノニオン系界面活性剤を電極付近に塗布することにより、測定液の吸収、それに引続く混合層の溶解に寄与し、測定精度を向上させるという効果も得られる。

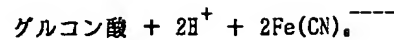
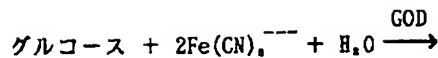
【0020】グルコースがGODの作用により酵素の存在下で酸化されてグルコノラクトンを生成させ、そのとき発生する $\text{H}_2\text{O}_2$ を作用極上で酸化し、その際の酸化電流値を測定することにより、グルコース濃度を間接的に求める方法は周知である。しかしながら、測定液が水で希釈されない原液サンプルの場合には、酸化反応が溶存酸素濃度に律速されるため、グルコース濃度が約100mg/dl程度迄しか直線検量範囲を示さない。

【0021】そこで、溶液中濃度が有限である酸素の代わりに、電子伝達体がGODと共に用いられる。メディエータがフェリシアン化カリウム $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の場合、この反応は次のように進行する。

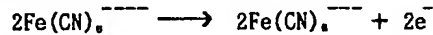
(4)

5

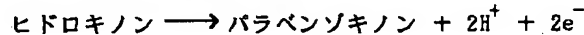
6



この際発生したフェロシアンイオンは、作用極で酸化されて酸化電流を生ずる。



【0022】また、メディエータとしてフェリシアン化カリウムの代わりにパラベンゾキノンを用いた場合に \*



\*は、GOD存在下でのグルコースとパラベンゾキノンとの反応でヒドロキノンが生成し、この際生成したヒドロキノン作用極で酸化され、酸化電流を生ずるのでその値が測定される。

【0023】一方、対極上には、特に何も固定化しなくとも使用し得るが、アルブミンおよび電子伝達体の少なくとも一種からなる混合物層を形成させて用いてもよい。この場合には、作用極上のみに混合物層を設けた場合にみられる測定液による混合物層の溶解、拡散に生じ勝ちな傾きがみられなくなる利点があり、測定精度も上昇する。

【0024】なお、固定化せしめたGODへの測定サンプル液の接触を円滑に行わしめるために、作用極上、対極上、作用極周辺、対極周辺、作用極上およびその周辺、対極上およびその周辺などに、ノニオン系界面活性剤を塗布したり、不織布、口紙等の含浸促進剤をスペーサ間隙を利用して挟着させるなどの手段を適用することも可能である。

【0025】グルコース濃度の測定は、このようにして作製されたグルコースバイオセンサに所定濃度のグルコース水溶液約0.1~10 $\mu$ lを接触させ、約1~120秒間程度反応させた後、そこに約0.05~1.5V、好ましくは約0.4~1.1Vの電圧を印加し、例えば印加10秒後の電流値を測定することによって行われる。測定には、ポテンショガルバノスタットおよびファンクションジェネレータが用いられる。

【0026】

【発明の効果】酸化還元酵素を電極上に固定し、作用極と対極とが対面構造をとるように配置したバイオセンサであって、製作が容易であるものが本発明によって提供される。

【0027】

【実施例】次に、実施例について本発明を説明する。

【0028】実施例1

前記した如き寸法を有する図1に示される態様のカーボン電極上に、更に約10 $\mu$ mの絶縁膜を形成させた図3に示されるバイオセンサにおいて、他端部に形成させた立上り部の端部接着剤層として、日東電工製品両面粘着テープ500番が用いられた。この場合、基板としては、ABS、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート等の折り曲げ構造をとり得る樹脂製基板が用いられる。

【0029】一方の基板端部に設けられた立上り部を他方の基板端部と接着、固定させる前の作用極上に、水1

mlにグルコースオキシダーゼ(165800単位/g)10mgおよびフェリシアン化カリウム48mgよりなる混合液(ドープ液)を1.5 $\mu$ l滴下して、室温条件下で乾燥させ、混合物層を形成させた。同様に、対極上にも混合物層を形成させた。なお、混合物層の形成に先立って、作用極部分および対極部分が不織布によって研磨されている。

【0030】上記グルコースバイオセンサに1 $\mu$ lのpH5.0のグルコース水溶液試料(濃度250mg/dl)を吸引させ、20秒間静置した後、作用極-対極間に0.9Vの電圧を印加し、印加10秒後の電流値(単位: $\mu$ A)を測定した。測定は10回行ない、CV値(平均値に対する標準偏差の割合)を算出し、3.2%という値を得た。測定には、ポテンショガルバノスタット(北斗電工製HA-501)およびファンクションジェネレータ(同社製HB-104)が用いられ、この装置に上記グルコースバイオセンサが取り付けられ、測定が行われた。なお、センサは1試料測定毎に使い捨てとした。

【0031】実施例2

実施例1において、混合物層の形成を作用極上のみに行うと、CV値は3.6%であった。

【0032】実施例3

実施例2において、ドープ液中にアルブミン10mgを更に添加して用い、グルコース水溶液のpHを7.0とすると、得られたCV値は3.9%であった。

【0033】実施例4

実施例2において、ドープ液をpH5.0の0.1Mクエン酸緩衝液として調製し、グルコース水溶液のpHを7.0とすると、得られたCV値は3.8%であった。

【0034】実施例5

実施例2において、ドープ液中にアルブミン10mgを更に添加し、またドープ液をpH5.0の0.1Mクエン酸緩衝液として調製し、グルコース水溶液のpHを7.0とすると、得られたCV値は3.7%であった。

【0035】実施例6

実施例5において、更にノニオン系界面活性剤(シグマ社製品トリトンX-100)を0.5%含有するドープ液を用いると、得られたCV値は3.6%であった。

【0036】実施例7

実施例2において、作用極の周辺に0.5%ノニオン系界面

(5)

7  
活性剤(トリトンX-100)を塗布し、乾燥させたバイオセンサを用いると、得られたCV値は3.5%であった。

【0037】なお、上記各実施例のいずれの場合にも、グルコース水溶液濃度0~1000mg/dlにおいて、良好な検量性が得られることを確認した。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るバイオセンサの一態様の断面図である。

【図2】バイオセンサの組立例を示す概略図である。

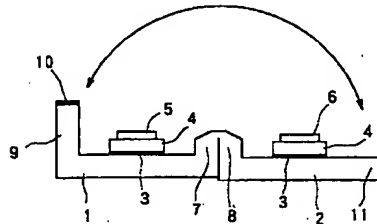
【図3】本発明に係るバイオセンサの他の態様の斜視図である。

【符号の説明】

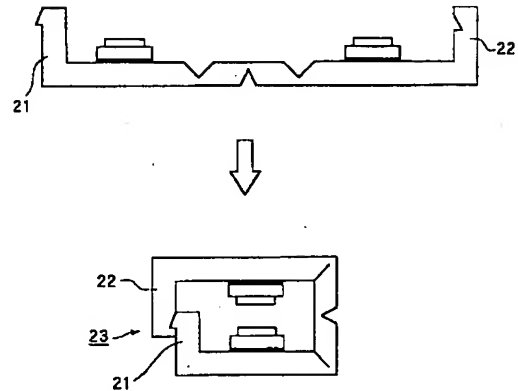
1, 31 一方の基板

2, 32 他方の基板  
3, 33 接着剤層  
4, 34 絶縁層  
5, 35 作用極  
6, 36 対極  
37 酸化還元酵素  
7, 8, 38, 39 折曲げ可能な立上り部  
9, 21, 22, 40 他端部立上り部  
10, 41 端部接着層  
11, 42 基板他端部  
23 係合構造  
43, 44 電極リード部  
45, 46 絶縁膜

【図1】



【図2】



【図3】

